MORPHOLOGISCHE STUDIEN AN ENDOMETRIUMZELLEN ZUR BESTIMMUNG DER ZYKLUSPHASEN IN VITRO

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelgt von

WALTER SKRIPITZ

Saarbrücken

1972

Aus der geburtshilflich-gynäkologischen
Abteilung des St. Martinus-Krankenhauses
Düsseldorf

Chefarzt: Professor Dr. med. M. K r a h e

MORPHOLOGISCHE STUDIEN AN ENDOMETRIUMZELLEN ZUR BESTIMMUNG DER ZYKLUSPHASEN IN VITRO

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1971

vorgelegt von

WALTER SKRIPITZ
geb. am 28.9.1939 in Altenkirchen/Ww.

Dekan: Prof. Dr. med. H. K u h l e n k a m p f f
Referent: Prof. Dr. med. M. K r a h e

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am
I. 6. 1972 abgelegt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	2
II.	Geschichte der Endometriums-züchtung	6
III.	Beschreibung der angewandten Methodik	13
IV.	Experimenteller Teil Ergebnisse eigener Untersuchungen	16
V.	Zusammenfassung	40
VI.	Diskussion	44
VII.	Literaturverzeichnis	47

Einleitung

Es bestehen enge Beziehungen zwischen den morphologischen Veränderungen des Endometriums während des Zyklus und der wechselnden Funktion endokriner Drüsen. Sorgfältige Untersuchungen, die schon zu Beginn des Jahrhunderts geführt wurden, haben enge funktionelle Wechselbeziehungen zwischen Ovar und dem Erfolgsorgan Endometrium aufgezeigt.

So werden die Regeneration und das weitere Wachstum des Endometriums von den im Ovar gebildeten Östrogenen angeregt.

Die sekretorische Umwandlung des proliferierten Endometriums unterliegt den in der Corpusluteum-Phase gebildeten Progesteronen.

Aber nicht nur die im Ovar gebildeten Hormone haben Einfluß auf die Uterusschleimhaut, sondern das physiologische Gedeihen des Endometriums ist, wenn auch indirekt, abhängig von den Hormonen der Nebennierenrinde und der Schilddrüse.

Es ist allgemein anerkannt, daß Störungen der Schilddrüsenfunktion häufig mit solchen der Eierstockfunktion einhergehen.

Die Unter- und Überfunktion der Nebennierenrinde verbindet sich mit Störungen des ovariellen Rhythmus.

So zeigt sich z. B. beim Morbus Addison eine Oligo- oder Amenorrhoe, die dadurch bedingt ist, daß eine verminderte Gonadotropinausschüttung vorliegt, die ihrerseits die Eierstöcke nicht ausreichend stimuliert.

Hormonal gestörtes Endometrium, gleich ob die Ovarialfunktion direkt oder indirekt gestört ist, bedarf einer Behandlung.

Um eine gezielte hormonelle Behandlung durchzuführen, wäre die Kenntnis der zyklisch wechselnden Hormonkonzentration innerhalb der Endometriumsgefäße von Bedeutung.

Eine quantitative Bestimmung der Sexualhormone und ihrer Metaboliten im Blut der zuführenden und ableitenden Uteringefäße ist aber wegen technischen und methodischen Schwierigkeiten nicht durchführbar.

Die hormonale Behandlung erfolgt aus der klinischen Erfahrung. Ein vorliegender Östrogen- oder Gestagenmangel läßt sich dadurch abklären, daß bei der Zufuhr ovarieller Hormone physiologische Östrogen- oder Gestageneffekte erreicht werden, die am Eileiter, am Endometrium, der Zervix und der Vagina abgelesen werden können.

Über die Abbauprodukte der Hormone, die im Urin feststellbar sind, läßt sich annähernd eine Aussage über die fehlenden ovariellen Hormone und

Hormonkonzentrationen machen. Damit kennt man aber noch nicht die Hormonkonzentration- und Kombination ,die ein hormonell erkranktes Endometrium zur Heilung bedarf.

Eine qualitative und annähernd quantitative Aussage fehlender Hormone, die Ursache einer hormonellen Endometriumsstörung sind, könnte anhand gezüchteter hormonell gestörter Endometriumsexplantate getroffen werden.

Dazu wird hormonell gestörtes Endometrium in einem speziellen Gewebezuchtverfahren ausgepflanzt. Mit Hilfe verschiedener Hormonzusätze zum Kulturmedium wird versucht, dieses erkrankte Endometrium in vitro in ein gesundes, phasengerechtes Endometrium überzuführen. Die dabei angewandten Hormonkonzentrationen- und Kombinationen lassen Rückschlüsse auf einen therapeutischen Nutzen in vivo zu.

Dieses Verfahren würde es ermöglichen, speziell für jedes gestörte Endometrium und für jede erkrankte Frau, die zur Heilung spezifische Hormonkombination- und Konzentration auszutesten.

Nicht nur reine Hormone, sondern auch ihre Stoffwechselprodukte könnten in ihrer Wirkung auf das Endometrium ausgetestet werden. Auch die Metaboliten der Nebennierenrinde und der Schilddrüsenhormone sind in ihrer Wirkung direkt auf die Endometriumzelle untersuchbar.

Ferner wären die im Handel befindlichen Präparate in ihrer Wirksamkeit auf die Gebärmutterschleimhaut zu prüfen.
Grundlage dieser Untersuchungen sind Zellkulturen gesunder Endometriumsexplantate.
Gelingt es im Gewebezuchtverfahren entnommenes Endometrium von gesunden Frauen in vitro zu klassifizieren, daß man anhand histochemischer und morphologischer Kriterien an der Zellkultur das Stadium des Zyklus ablesen kann, so sind Vergleiche zum hormonal gestörten Endometrium in vitro gegeben. Die Morphologie der Zellkultur des erkrankten Endometriums kann nun durch Hormonzusätze in ein phasengerechtes Bild überführt werden.
Die dazu benötigten Hormonkonzentrationen- und Kombinationen sind in vivo bei der erkrankten Frau als Therapie einsetzbar.
In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, morphologische und histochemische Kriterien aufzudecken, die es erlauben, jedes explantierte gesunde Endometrium dem Stadium des Zyklus zuzuordnen, in dem das Gewebe entnommen wurde.

Geschichte der Endometriumszüchtung

Untersuchungen über die Auspflanzungen von menschlichem Endometrium in einem künstlichen Nährmedium sind nicht neu. Schon im Jahre 1926 versuchte A. MEIER (18) an Endometriumsexplantaten den histologisch nachweisbaren Phasenwechsel auch am kultivierten Gewebe nachzuweisen. In Zusammenarbeit mit HEIM (10 und 11) konnten Endometrien aus allen Phasen, sogar Decidua bis zum 4. Schwangerschaftsmonat gezüchtet werden. Eine Differenzierung der Zellen bezüglich der Zyklusphase gelang jedoch nicht.

Später untersuchte CAFFIER (3) menstruelle Desquamate. Er erreichte zwar eine Proliferation der Zellen, die aber keinen Rückschluß auf das Ursprungsgewebe zuließen.
HEIM und CAFFIER beschrieben eingehend Form und Gestalt der gezüchteten Zellen, eine Aussage, ob diese proliferierten Zellen Stroma- oder Drüsenzellen sind, wagten sie nicht zu treffen. Erst CRON und GEY (4 und 5) glaubten, daß die ausgewachsenen Zellen, der kultivierten menstruellen Desquamate den Epithelzellen zuzuordnen sind. Ein eindeutiger Beweis wird aber von ihnen nicht erbracht.

1928 entdeckte TRAUT (27), daß Endometriumzellen aus der Proliferationsphase schneller wachsen als jene

Zellen der Endometriumsexplantate der Sekretionsphase. Diese Beobachtung wird von HIRSCH und JONES (8) und später von MOORE (31) bestätigt. Auch PAPANICOLAOU und MADDI (22) sahen eine besonders starke Wachstumsaktivität der Endometriumsexplantate, die aus der Proliferationsphase stammten.

Im Jahre 1955 konnte MARKUSE (16) an gezüchtetem Endometrium im hängenden Tropfen durch Phasenkontrastuntersuchungen spindelförmige Stromazellen von polygonal-flächenhaft wachsenden Epithelzellen unterscheiden.

In den darauf folgenden Jahren gelang es PAPANICOLAOU und MADDI, die Endometriumsexplantate über mehrere Jahre untersuchten, Fibroblasten, Epithelzellen und endotheliale Zellelemente zu differenzieren. Sie fanden morphologische Unterschiede zwischen den Stroma- und Epithelzellen des Endometriums. So konnten sie erstmalig auf zytomorphologische Unterschiede der auswachsenden Zellen hinweisen. Es zeigten sich bei gezüchtetem Gewebe aus der Proliferationsphase typische epitheliale Zellmembranen mit Austritt von einzelnen Zellen in die offenen Drüsenlumina. Das Gewebe der Sekretionsphase war dadurch charakterisiert, daß einschichtige Epithelzellreihen, die später zu einem Gewebsverband proliferierten, auftraten.

PAPANICOLAOU und MADDI züchteten Gebärmutterschleimhaut nach der Maximow-Doppeldeckglasmethode. Das Gewebe wurde im Verband in die Kammer gegeben und unter ständigem Mediumwechsel zum Wachsen gebracht. RANDALL, STÜRMER und STEIN (20) züchteten das Gewebe nicht, wie alle vor ihnen, im Plasma-CLOT-Verfahren, sondern sie trypsinierten das Gewebe und untersuchten den Sauerstoffverbrauch an einer Zellsuspension. Explantiertes Gewebe aus der Proliferationsphase zeigte einen eindeutig höheren Sauerstoffverbrauch.

1960 stellte FIGGE (29) bei Untersuchungen am menschlichen Endometrium in der Gewebekultur eine Vermehrung des Ribonucleoproteids in der Proliferationsphase und eine Verminderung des Proteids in der Sekretionsphase fest. Diese Untersuchungen erfolgten im Serum und Hühnerembryonalextrakt. Bezüglich des Glycogens wurden keine zyklisch abhängigen Veränderungen in den Zellen gefunden.

KULLANDER und KÄLLEN (12), die die fibrinolytische Aktivität des menschlichen Endometriums untersuchten, konnten nur nach Zugabe von Lysinaethylester eine verminderte fibrinolytische Aktivität des Endometriums aus der Proliferationsphase feststellen.

1959 veröffentlichte TROWELL (28) in der Experimental Cell Research Arbeiten über Endometriumszüchtungen. Entnommene Schleimhaut wurde in Streifen von 1-2 mm Länge geschnitten und auf feinporiges Filterpapier ausgepflanzt. Als Medium diente das TC 199 und Kälberserum. Das Gewebe wurde bei 37 Grad inkubiert und in Gewebekammern mit 90% O_2 und 5% CO_2 durchströmt.
Nach der gleichen Züchtungsmethode ging im Jahre 1969 E.C. HUHGES (9) vor. Er untersuchte den Östrogen- und Progesteroneffekt am gezüchteten Endometrium und konnte nachweisen, daß die Hormone eine direkte spezifische Wirkung auf das Gewebe haben.
Bei einer Zugabe von 0,5 mg% Progesteron zeigte das explantierte Gewebe eine sekretorische Umwandlung und eine signifikante Vermehrung der Glycogentropfen in den Zellen. Gleichzeitig vermehrte sich der Glycosegehalt des Kulturmediums. Unter Gaben von 0,1 mg Östradiol veränderte sich die Zellmorphologie. Die Drüsenzellen wurden grösser, die Drüse selbst veränderte ihre Form. Der Glycogengehalt der Zellen blieb unter dem Einfluß von Östrogenen unverändert. Lediglich bei Schleimhäuten von sterilen Frauen zeigte sich ein Glycogenanstieg nach Zugabe von Östradiol.

Mit dieser Arbeit hatte HUHGES gezeigt, daß Endometrium isoliert von endokrinen Einflüssen und der Komplexität der anderen Organe direkt auf Hormoneinflüsse anspricht. Östradiol verursacht eine Proliferation und Wachstumsänderung und bereitet den Prozeß der Glycogenese vor. Progesteron bewirkt eine sekretorische Umwandlung, erhöht die Zellpermeabilität für Glycogen und besitzt einen stimulatorischen Effekt für die Glycogen-Phosphorylase.

Auch KOHORN und R. TCHAO (13) konnten in ihren 1969 veröffentlichten Arbeiten nachweisen, daß Progesteron direkt auf das Endometrium Einfluß nimmt.

Die Erscheinung der Sekretion wurde bislang als eine Indikation des Progesteroneffektes angesehen, Beide Autoren fanden, daß unter dem Einfluß von Progesteron in den Drüsenzellen eine Muco-Poly-Saccharide Sekretion hervorgerufen wird, die für die sekretorische Umwandlung verantwortlich ist. Sie widerlegten somt die elektronen-mikroskopischen Untersuchungen von W.H. LUGINBUHL (15), der annahm, daß Progesteron nicht für die sekretorische Aktivität der Drüsenzellen verantwortlich ist.

In den letzten drei Jahren untersuchte man ausschließlich Hormone in ihrer Wirkung auf das isolierte Endometrium. Eine Untersuchung auf die ein-

zelne Zelle selbst nahm man nicht vor. Gleichfalls konnten bisher die aus allen Endometriumskulturen ausgewachsenen Zellen nicht eindeutig dem Stroma oder dem Epithel zugeordnet werden, obwohl PAPANICOLAO von Zelltypen spricht, die stromatogener und epithelialer Herkunft sind.

1963 untersuchte M. KRAHE (14) das morphologische Verhalten des Endometriums in Monolayer-Kulturen.

Das entnommene Gewebe wurde in Anlehnung an das Verfahren, von DULBECCO und VOGT (6 und 32) in einzelne Zellen auftrypsiniert und als Zellsuspension in der Gewebekammer bei plus 37 Grad Cel. inkubiert. KRAHE untersuchte 24 Endometriumsexplantate von denen 18 Kulturen beurteilbar waren.

Er konnte, wie auch schon PAPANICOLAOU und MADDI, im wesentlichen zwei Zelltypen des Endometriums in vitro unterscheiden. Eine spindelige Zellform und polygonale Zellen.

Konstant auftretende Besonderheiten der Wuchsform der ausgepflanzten Zellen in Abhängigkeit der Zyklusphasen konnten nicht nachgewiesen werden. Bei Vergleichen über die Wuchsform des Endometriums im Plasma - CLOT - Verfahren fallen Besonderheiten im Erscheinungsbild der Endometriumzellen auf, die mit

Hilfe des Trypsinierungsverfahrens gezüchtet worden sind.
KRAHE (14) beschrieb in einigen Kulturen ein netzförmiges Auswachsen der Fibroblastenanteile, in deren Maschen sich Epithelinseln ausbildeten. Obwohl diese Wachstumsart in fast allen Phasen des Zyklus anzutreffen war, fiel es auf, daß die Ausbildung des Fibroblastennetzes und die darin gelegenen Epithelnester am deutlichsten und häufigsten bei Endometriumskulturen auftraten, deren Gewebe aus der Proliferationsphase stammten.

In der vorliegenden Arbeit soll anhand einer größeren Anzahl von Endometriumskulturen das von M. KRAHE erstmalig beschriebene Erscheinungsbild eingehend untersucht werden und nach morphologischer Differenzierung der Zellen eine Zuordnung des explantierten Endometriums zum Stadium des Zykluses erfolgen.

Methodik

Als Gewebekulturverfahren kommt die von DULBECCO-VOGT (6) beschriebene Trypsinierungsmethode zur Anwendung.

Frisch entnommenes menschliches Endometrium, das z. T. Operations- und Abrasionsmaterial entstammt, wird in einer Phosphat-Puffer-Lösung aufgefangen, die einen Zusatz von Antibiotika (Streptomycin und Penicillin) enthält, um eine Verunreinigung des Materials zu vermeiden. Das Versuchsmaterial verbleibt für 1-2 Stunden bei 4-5 Grad Celsius in der Lösung. Vor der weiteren Bearbeitung wird ein Teil des Materials zur genauen Differenzierung histologisch untersucht.

Das zur Kultur vorgesehene Gewebsstück wird von Blutbeimengungen und nekrotischen Anteilen mit sterilen kleinen Tupfern gereinigt und mehrmals in Phosphat-Puffer-Lösung gewaschen. Anschließend zerkleinert man das Gewebsstück mit Hilfe einer gebogenen Schere zum Gewebsbrei. Nun folgt die fermentative Aufspaltung der Schleimhaut in Einzelzellen durch eine 0,5%ige Trypsinlösung. Die Trypsinierung findet in Anlehnung an DULBECCO-VOGT in einem Trypsinierungskolben bei plus 37 Grad

Celsius im Brutschrank statt. Ein Magnetrührer bereitet unter ständigem Rühren das Gewebe auf. Schon etwa nach 10-15 Minuten ist der Trypsinierungsprozeß abgeschlossen. Bei etwas härterem Gewebe wird erneut trypsiniert, bis endgültig alle Zellen aus dem Verband gelöst sind.

Die gesamte Trypsinlösung filtriert man durch eine sterile, nicht chemisch präparierte Mullage, um zu vermeiden, daß größere Gewebsstücke oder Zellkonglomerate in die Kultur gelangen. Nur von Chemikalien freier Mull darf verwendet werden, da möglicherweise beim Filtrieren Substanzen frei werden können, die eine toxische Zellschädigung hervorrufen.
Die erhaltene Zellsuspension wird anschließend durch fraktioniertes Zentrifugieren und Resuspensieren in Phosphat-Puffer-Lösung vom Trypsin gereinigt. Danach werden die Zellen mit Nährmedium versehen. Als Medium dient eine Modifikation des Tissue Culture Medium 199, dem Kälberserum, Glutaminsäure und eine Vitaminmischung beigegeben ist. (MORGEN, MORTEN und PARKER (33)).

Bei der Explantation der Zellsuspension ist man bestrebt, eine Zellkonzentration von 300.000 Zellen pro ml. Medium zu erreichen. Die Sedimentierung erfolgt bei 1.200 Umdrehungen pro Minute.

Die Auspflanzung wird zu Portionen von 1 ml. in sogenannte LEIGHTON-Tubes vorgenommen. In diesen Reagenzgläsern ist der untere Anteil des Glases plan, so daß kleine Deckgläser eingelegt werden können, auf denen die Zellen auswachsen.

Nach etwa 3-4 Tagen sind die ausgepflanzten Zellen zu einem mehr oder weniger geschlossenen Zellrasen ausgewachsen. Das Medium wird, sobald es verbraucht ist, ausgewechselt. Als Indikator dient eine Phenolrotlösung, die beim Umschlag nach gelb die Unbrauchbarkeit der Lösung anzeigt. Die Deckgläser werden bei ausgebildetem Zellrasen und nach verschiedenen Stunden den LEIGHTON-Tubes entnommen, fixiert und gefärbt. Anschließend erfolgt am fixierten und gefärbten Präparat die vergleichende mikroskopische Untersuchung.
Die Fixierung der auf den Deckgläsern ausgewachsenen Zellen erfolgt bei minus 7 Grad Celsius nach CARNOY. Die anderen Fixierungsmethoden nach BOUIN, ROSSMANN und GENDRE haben sich nicht als geeignet erwiesen. (H.M. RAUEN (23)).
Bei der Fixierung nach BOUIN und ROSSMANN wurden häufig die Zellen vom Deckglas abgewaschen. Möglicherweise ist hier der Pikrinsäureanteil im Fixierungsmittel das schädigende Agens. Die nach GENDRE fixierten Kulturen wurden aus dem gleichen Grund zerstört. Als Färbung des Präparates dient

die typische Hämatoxilin-Eosin-Färbung.
Es sei noch zu erwähnen, daß wir nach anfänglich auftretenden Pilzverunreinigungen den Endometriumskulturen 50 E. Moronal pro ml Nährlösung zugaben. Die moronalhaltige Nährlösung wurde nach kurzer Einwirkung auf die explantierten Zellen durch frisches Medium ersetzt.

Eigene Untersuchungen

Über einen Zeitraum von 2 1/2 Jahren wurden unter homogenen Versuchsbedingungen hundert Endometriumskulturen untersucht und bearbeitet. Von diesen 100 Ansätzen wuchsen 77 Explantate aus.
Pilze und Bakterien oder zurückgebliebene Schwefelsäurebestandteile, die beim Waschen der LEIGHTON-Tubes nicht völlig entfernt werden konnten, zerstörten die 23 nicht gewachsenen Kulturen.

In 77% der Fälle proliferierten die ausgesäten Zellen gut und zeigten in vitro oft ein erstaunlich schnelles Wachstum. Durchschnittlich züchteten wir die Explantate 158 Stunden. Zu lange Züchtungszeiten gehen mit einer Entdifferenzierung der Zellen einher. Subkulturen legten wir nicht an.

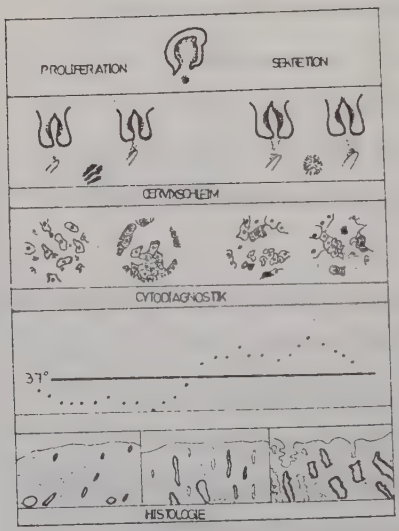
Das zu züchtende Endometrium stammte von geschlechtsreifen Frauen, die hysterrektomiert oder abradiert wurden. Das Durchschnittsalter der Frauen lag bei 36,4 Jahren. Wir entnahmen Gewebe nur von solchen Probanden, in deren Krankheitsgeschichte keine endokrinologische Erkrankung vorlag, und aus deren Anamnese ein normaler, regelmäßiger Zyklus bekannt war. Das regelmäßige Auftreten einer Monatsblutung gestattet aber noch keinen Rückschluß auf eine biphasische Ovarialfunktion.

Da in der vorliegenden Arbeit das Verhalten von Endometriumskulturen in verschiedenen Zyklusphasen untersucht werden soll, erscheint es wichtig zu wissen, ob das entnommene Gewebe einem Mono- oder Biphasischen Zyklus entstammt. Die errechnete Zyklusphase mußte mit der Vaginalzytologie und der Endometriumshistologie übereinstimmen.

Lagen die Patientinnen längere Zeit vor der Operation oder Abrasio stationär, ließen wir zusätzlich die Basaltemperatur messen und untersuchten vor der Entnahme der Schleimhaut den Cervixschleim, der ebenfalls einen Aufschluß über die Zyklusphase gibt.

Die untenstehende Abbildung veranschaulicht alle Maßnahmen, die wir zur eindeutigen Bestimmung der Zyklusphase durchführten.

Abb. 1



In Anlehnung an Buttenberg.

In den 77 Kulturen wurde Endometrium aus der frühen Proliferationsphase, 4.-7. Zyklustag, der mittleren Proliferationsphase, 8.-10. Zyklustag, und der späten Proliferationsphase, 11.-14. Zyklustag, untersucht.

Das Gewebe aus der Sekretionsphase entstammte dem 15.-19. Zyklustag, dem 20.-26. Zyklustag und der prämenstruellen Phase (26.-30. Zyklustag).

In der frühen Follikelphase, etwa um den 5.-8. Tag der Regel, wachsen die Zellen in den Kulturen zunächst als Spindelzellen aus. Schon wenige Stunden nach der Explantation sind neben noch völlig abgerundeten Zellbestandteilen spindelige Zellformen erkennbar. Vereinzelt finden sich auch Zellen mit polygonaler Form. Die Spindelzellen zeichnen sich dadurch aus, daß ihr Zytoplasma anfänglich nach einer Seite, wenig später aber schon ein zweiseitig gerichtetes Wachstum aufweist.

In der Abbildung 2 und 3 ist eine Kultur des 5. Zyklustages, 4 1/2 Stunden nach Explantation dargestellt.

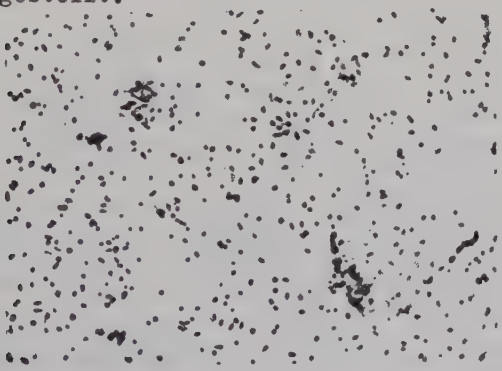


Abb. 2

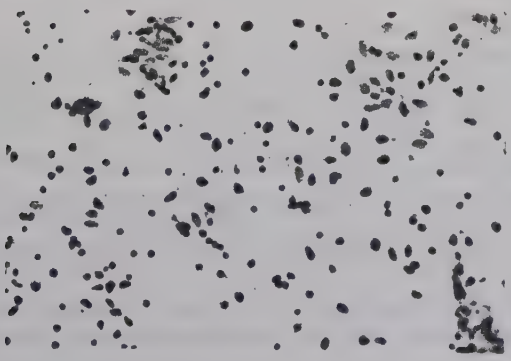


Abb. 3

Die zunächst einzel-liegenden Spindelzellen drängen sich schon nach wenigen Stunden zusammen und wachsen alle nach einer Richtung aus. Die Abbildung 4 zeigt eine solche Ansammlung von Spindelzellen, die dichtgedrängt in gleicher Richtung nebeneinander liegen. Bei der Betrachtung des Bildes drängt sich der Vergleich mit einem Fischzug auf. Dieses fischzugartige Wachsen der Spindelzellen konnte immer wieder bei explantiertem Gewebe aus der frühen Proliferationsphase gefunden werden.

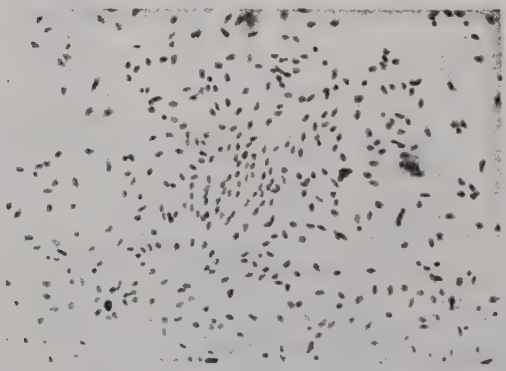


Abb. 4

Endometrium 5. Zyklustag, 13 Std. nach Explantation.

Schon drei Tage später erscheinen zwischen den Spindelzellanordnungen Epithelnester. Es handelt sich um die gleiche Kultur, 67 Stunden nach der Auspflanzung. Fischzugartig liegen die Spindelzellen, teils dicht gedrängt, um einen Zellhaufen, dessen Zellen anders geartet sind.

In der Vergrösserung, Abb. 6, erkennt man einen kräf-

tig gefärbten Kern, der von flächenhaftem, breitem Zytoplasma umflossen wird.

Die Abbildungen 5 und 6 veranschaulichen dieses Wachstumsstadium.

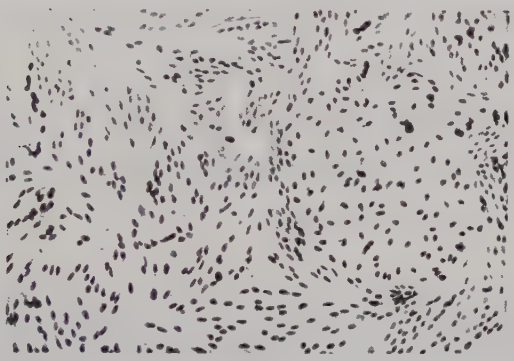


Abb. 5
Endometrium
5. Zyklustag,
67 Std. nach Explantation.

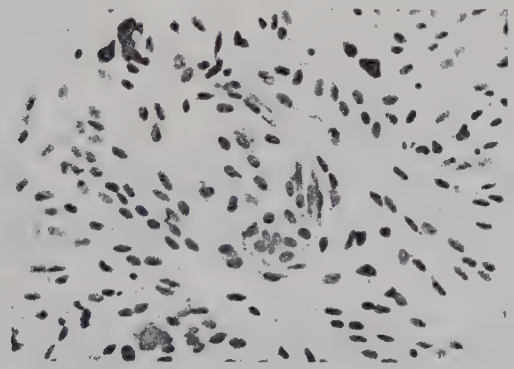


Abb. 6
Endometrium
5. Zyklustag.

Die Kulturen des 5. Zyklustages wurden durchschnittlich 150 Stunden gezüchtet, und zeigten immer wieder die vorher beschriebenen Wachstumseigenschaften. Lediglich bei längeren Züchtungszeiten änderte sich das Bild. Die epithelialen Zellelemente gingen zugrunde, und nach etwa 305 Stunden beherrschten nur noch Fibroblasten das Bild.

Die Kulturen der mittleren Proliferationsphase, deren Gewebe dem 7.-10. Zyklustag entstammte, wiesen keine wesentlichen Verhaltensänderungen des Wachstums auf. Die Anzahl der Epithelnester nahm zu. Das fischzugartige Auswachsen der Spindelzellen blieb unverändert.

Die folgende Bilderserie zeigt das Wachsen einer Kultur des 8. Zyklustages, wenige Stunden nach der Explantation bis zum 3. Züchtungstag.

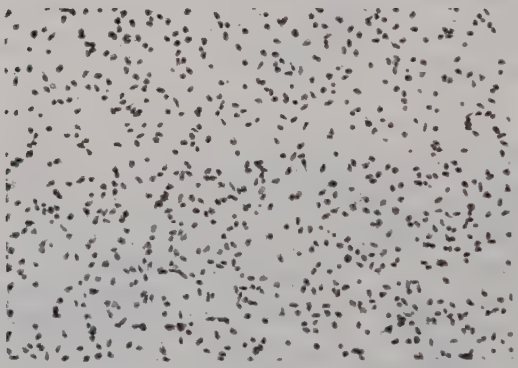


Abb. 7
Endometrium
8. Zyklustag,
4 1/2 Std. nach
Explantation.

Abb. 8
Endometrium
8.Zyklustag,
7 Std. nach Ex-
plantation.
Übersich

Abb. 9

Endometrium 8. Zyklustag, 7 Std. nach Explantation.

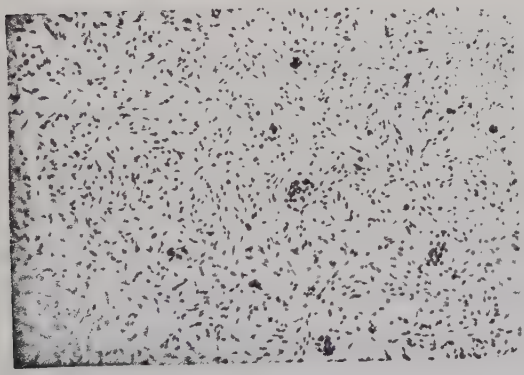


Abb. 10

Endometrium 8. Zyklustag, 19 Std. nach Explantation.

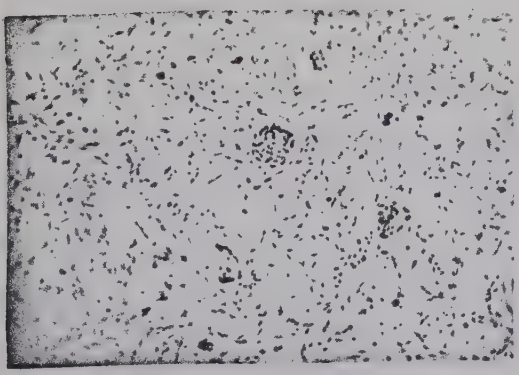


Abb. 11

Endometrium 8. Zyklustag, 19 Stunden nach Explantation. A u s s c h n i t t.

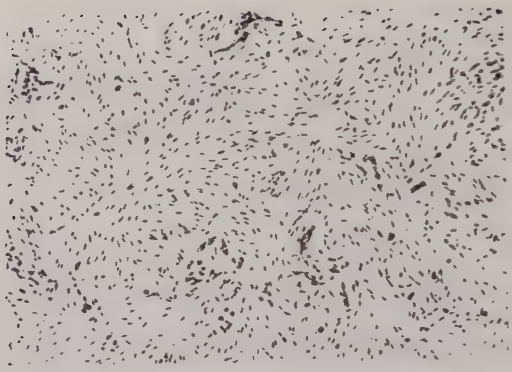


Abb. 12
Endometrium 8. Zyklustag, 55 Std. nach Explantation.

Mit dem Fortschreiten der Follikelphase ändert sich das Wachstum der Kulturen. Die späte Proliferationsphase ist durch das Erscheinen von netzartigen Strukturen gekennzeichnet. Die Netzstrukturen werden ausschließlich von Spindelzellen gebildet und sind in allen Kulturen dieses Zyklusabschnittes nachweisbar. Die Netze nehmen mit den Zyklustagen an Stärke zu und haben ihren Höhepunkt am 11. Zyklustag erreicht.

5 Stunden nach der Explantation von Gebärmutterschleimhaut, die am 11. Zyklustag entnommen wurde, ist schon andeutungsweise eine netzartige Struktur erkennbar. Nach 22 Stunden ist das Netzwerk deutlich ausgebildet, und nach weiteren 4 Stunden findet sich ein völlig ausgebildetes Netz.

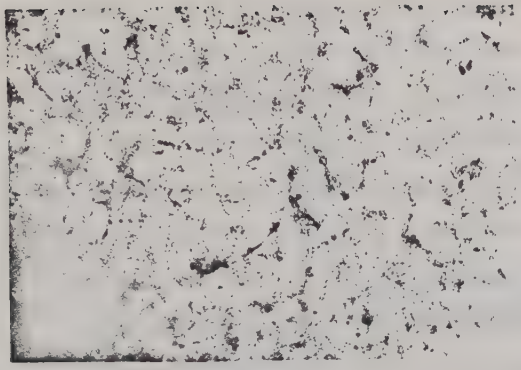


Abb. 13

Endometrium 11. Zyklustag, 5 Std. nach Explantation.

Abb. 14

Endometrium 11. Zyklustag, 22 Std. nach Explantation.

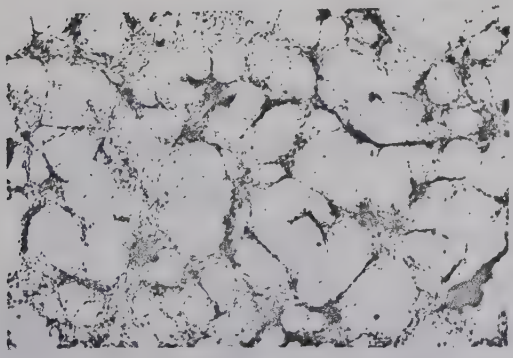


Abb. 15

Endometrium 11. Zyklustag, 26 Std. nach Explantation.

In den Überkreuzungspunkten des Netzwerkes fällt eine dicht gedrängte Zellansammlung auf. Von diesen, fast zu Klumpen gelagerten Zellen, geht nach vollständiger Ausbildung der Netzstruktur ein flächenhaft epitheliales Wachstum aus, so daß sich nach und nach die Maschen des Netzes mit Epithelnestern ausfüllen. Man gewinnt hier erstmalig den Eindruck einer Drüsenstruktur, deren Zellen zweifellos primär aus den dichten Zellkernzusammenballungen der Netzknotenpunkte stammen.

Die folgenden 3 Abbildungen zeigen in zeitlicher Folge die Bildung der Epithelinseln in den Maschen eines von Spindelzellen gebildeten Netzes.

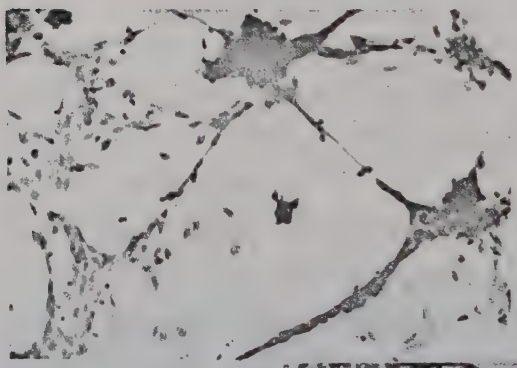


Abb. 16
Endometrium 11. Zyklustag, 24 Std. nach Explantation.

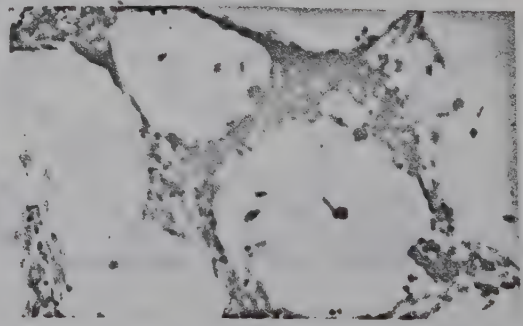
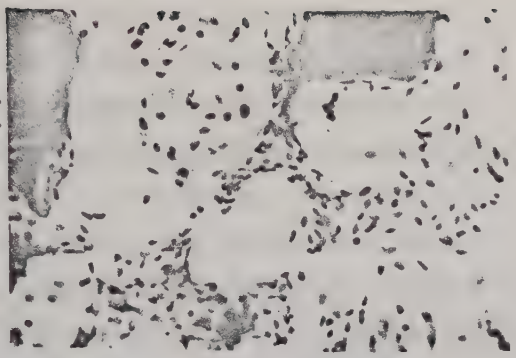


Abb. 17
Endometrium 11. Zyklustag, 26 Std. nach Explantation.

Abb. 18
Endometrium 11. Zyklustag, 48 Std. nach Explantation.



24 Stunden nach der Auspflanzung liegen die Zellen fast nacktkernig in den Knotenpunkten des Netzwerkes noch dicht gedrängt. Schon nach 2 Stunden ist eine Auflockerung in den Zellansammlungen nachweisbar. Einzelne Zellen lösen sich aus dem Verband und proliferieren in den freien Raum. Ihr Zytoplasma wird zu diesem Zeitpunkt deutlich sichtbar und die Zelle selbst nimmt die polygonale Form einer epithelialen Zelle an. Zwei Tage nach der Zellexplantation finden sich abgerundete Epithelzellnester in den Maschen eines Netzwerkes.

Bei der Untersuchung der Zellen auf ihren Glycogengehalt treten zu diesem Zeitpunkt zum erstenmal PAS-positive Substanzen in den Epithelzellen auf. Bei allen vorangegangenen Kulturen können Glycogeneinschlüsse im Zytoplasma der epithelialen Zellen nicht nachgewiesen werden. So zeigt sich an Hand der Zellkultur, daß Glycogen schon präovulatorisch in den Zellen, die dem Drüsenepithel entstammen, vorhanden ist.

Diese Feststellung ist nicht neu. Sie steht aber im Gegensatz zu alten, anders lautenden Befunden. Histochemische Untersuchungen der Gebärmutterschleimhaut weisen Glycogenvorkommen in den Drüsenzellen erst im Stadium der mittleren Sekretionsphase nach. THEMANN und SCHNÜKE (26) fanden bei elektronenmikroskopischen Bildern aber schon am 9. Zyklustag Glycogeneinschlüsse in den Drüsenzellen. Im Lichtmikroskop konnte später SCHMIDT-MATTHIESEN (25) wie viele andere Autoren am proliferierten Endometrium mit der PAS-Reaktion winzige Glycogenpartikel in der basalen Hälfte der Drüsenzellen nachweisen. Der Grund dafür, daß vorhergehende Untersucher das Glycogen nicht beschreiben konnten, sieht SCHMIDT-MATTHIESEN in einer unzureichenden Gewebefixation und in der Färbung nach BEST.

Wir hielten uns in der Darstellung des Glycogens an die von SCHMIDT-MATTHIESEN empfohlene Methode. Nur fixierten wir die Zellen nicht nach ROSSMANN, sondern wie vorher schon erwähnt nach CARNOY bei minus 7 Grad Celsius. Die Färbung wurde nach einer Modifikation der PAS-Reaktion vorgenommen. An Stelle der sonstigen histochemisch gebräuchlichen SCHIFF'SCHEN-Lösung, setzten wir das SCHIFF'SCHE Reagenz DAB 6 ein. Die PAS-positiven Substanzen konnten mit Hilfe des Diastasetestes als Glycogen identifiziert werden.

Mit dem Übergang in die Sekretionsphase bleibt primär die netzartige Struktur angedeutet. Eine Kultur des 15. Zyklustages 17 1/2 Stunden nach der Explantation zeigt das Verhalten der frisch ausgepflanzten Zellen.

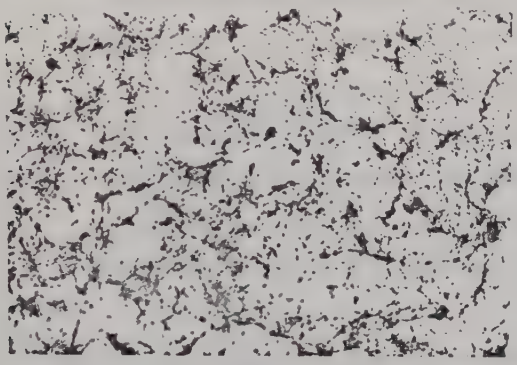
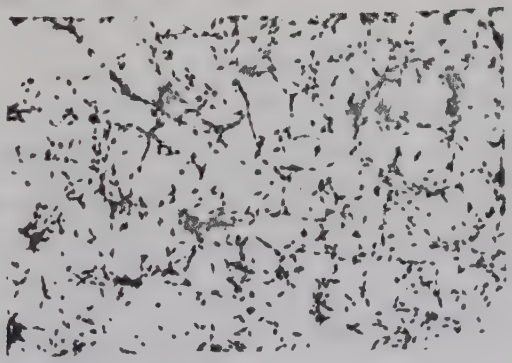


Abb. 19
Endometrium 15.Zyklustag, 17 1/2 Std. nach Explantation.

Abb. 20
Endometrium 15. Zyklustag, 20 Std. nach Explantation.



Die Spindelzellen finden noch mit ihren Zytoplasmaausläufern Kontakt zueinander. Eine ausgeprägte Netzstruktur wie in der späten Proliferationsphase ist jedoch nicht mehr vorhanden. Ebenfalls fehlt ein flächenhaftes epitheliales Wachstum, das von den Zellballungen der Netzknotenpunkte ausgeht.

Epitheliale Zellinseln sind in den Kulturen dieses Zykluszeitpunktes nicht mehr nachweisbar. Vereinzelt finden sich jedoch noch isoliert liegende Epithelzellen.

Mit dem Fortschreiten der Sekretionsphase und dem fortschreitenden Wachstum in der Kultur verschwindet die Netzstruktur völlig.
Die Spindelzellen sind teils wieder fischzugartig angeordnet und umgeben wirbelartig zahlreiche Epithelnester, die im Gegensatz zur mittleren Proliferationsphase jetzt kompakt und kräftig gewachsen sind.
Ein Vergleich mit der Kultur des 8. Zyklustages (siehe Seite 17), läßt deutlich den Unterschied erkennen.

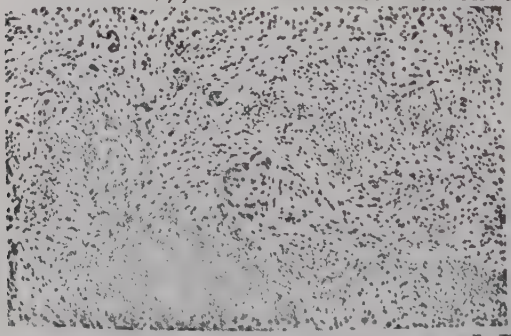


Abb. 21
Endometrium, 17. Zyklustag, 123 Std. nach Explantation.

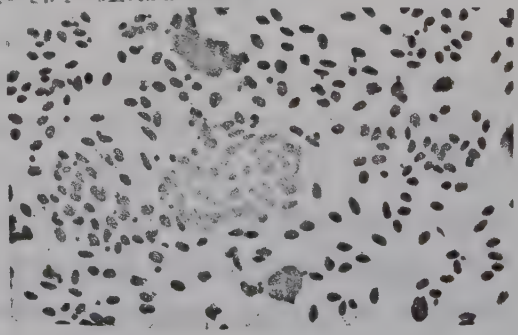


Abb. 22
Endometrium 17. Zyklustag, 123 Std. nach Explantation. (Kompaktes Epithelzellnest).

Zu diesem Zykluszeitpunkt, es handelt sich um den 17. Zyklustag, ist der nachweisbare Glycogengehalt in den epithelialen Zellen beträchtlich gestiegen. Das Glycogen liegt nicht mehr in kleinen Partikeln im Zytoplasma der Zellen, sondern füllt schon Teile des Zelleibes aus.

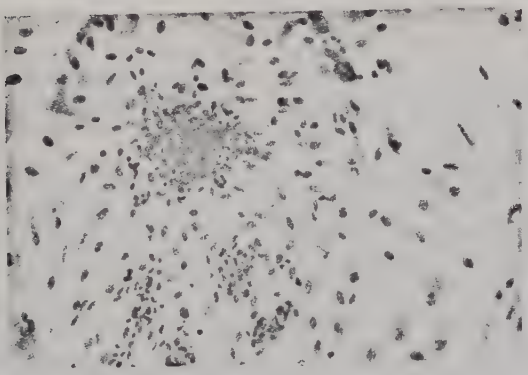


Abb. 23

Endometrium 17. Zyklustag, 163 Std. nach Explantation.

PAS-positive Substanzen in epithelialen Zellen.

Um den 20. Zyklustag ändert sich das Wachstum der Kultur wiederum. Die Spindelzellen treten in den Hintergrund, sie sind weder netzartig geordnet, noch zeigen sie ein wirbelartiges Wachstum. Zwischen den noch spärlich vorhandenen Stromazellen liegen Epithelplaques, die mit dem Fortschreiten der Kultur an Größe und Ausdehnung zunehmen.

Die folgende Bilderserie veranschaulicht das Wachstum einer Kultur des 20. Zyklustages, wenige Stunden nach der Explantation bis zum 4. Züchtungstag.

Abb. 24

Endometrium 20. Zyklustag, 7 Std. nach Explantation.

Abb. 25

Endometrium 20. Zyklustag, 13 Std. nach Explantation.

Abb. 26

Endometrium, 20. Zyklustag, 25 Std. nach Explantation.

Abb. 27

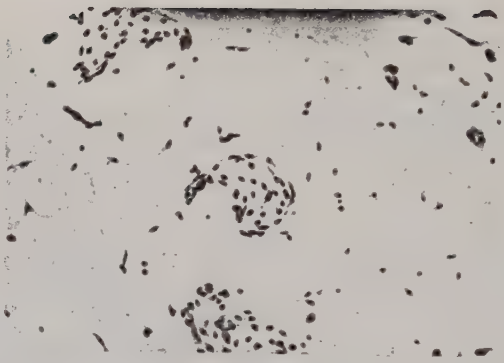
Endometrium, 20. Zyklustag, 43 Std. nach Explantation.

Abb. 28
Endometrium 20. Zyklustag, 92 Std. nach Explantation.

Beim Vergleich mit den Bildern der Proliferationsphase zeigt sich deutlich der Wachstumsunterschied, der sich noch stärker ausprägt, je weiter sich das Endometrium der Menstruation nähert. In den ersten Stunden der Explantation der Gebärmutterschleimhaut des 26. und 29. Zyklustages beherrschen nur noch Epithelplaques das Bild. Die Spindelzellen sind spärlich vorhanden und völlig in den Hintergrund getreten.

Die Epithelzellen liegen in kleinen Kolonien und fließen mit dem Älterwerden der Kultur zusammen. (Siehe Abbildung 30). Nach etwa 2-3 Tagen sind die Stromazellen völlig verdrängt, und es bildet sich ein epithelialer Zellrasen aus, der in den Kulturen des 20. Zyklustages zum gleichen Wachstumszeitpunkt noch nicht nachweisbar ist. (Siehe Abbildung 31).

Abb. 29
Endometrium 26.Zyklustag, 20 Std. nach Explantation.



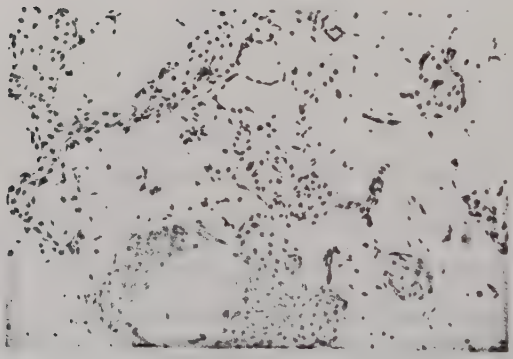
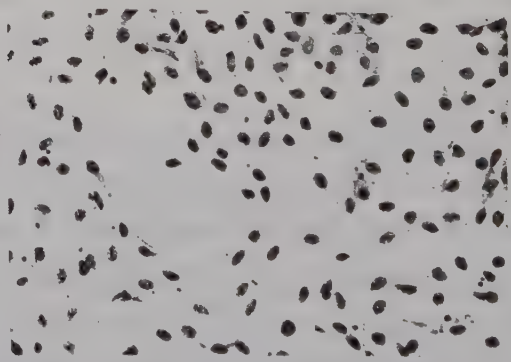


Abb. 30
Endometrium 26.Zyklustag, 72 Std. nach Explantation.

Abb. 31
Endometrium 26.Zyklustag, 120 Std. nach Explantation.



Die Abbildungen 32 und 33 zeigen eine Endometriumskultur des 29. Zyklustages. Das Gewebe entstammt einem operativ entfernten Uterus. Die Histologie ergab ein prämenstruelles Endometrium. Bei der Beobachtung der

Kultur finden sich schon wenige Stunden nach der Auspflanzung auf den Deckgläsern die oben beschriebenen Epithelplaques. 24 Stunden später suchen die Epithelkolonien Kontakt zueinander und konfluieren zu größeren Epithelzellansammlungen. Schon nach 70-92 Stunden ist die gesamte Kulturfläche von einem dichten Zellrasen überzogen. Kulturen des 26. Zyklustages weisen erst einen durchgehenden Zellrasen nach 120 Stunden auf. Mit dem Älterwerden der Kulturen werden die Zellen kräftiger. Die Vergrößerungsaufnahmen (Abbildungen 34 und 35) weisen kräftige runde Zellkerne auf, die reichlich von Zytoplasma umflossen werden. Eindeutig ist hier die Differenzierung der epithelialen Zellen von jenen Zellen, die dem Stroma entstammen, zu erkennen. Der Zelleib ist nicht spindelförmig gestaltet, sondern flächenhaft breit und von polygonaler Form. Auch der Zellkern hat seine spitz ovale Form verloren und ist abgerundet.

Nach längeren Züchtungszeiten, etwa um 300 Stunden, hebt sich der Zellrasen von der Unterfläche ab. Trotz häufiger Mediumwechsel gehen die Zellen zugrunde und schwimmen als Zellkonglomerate in der Lösung. Auf den entnommenen Deckgläsern bleiben nur noch vereinzelt Epithelzellen haften.

Abb. 32

Endometrium, 29. Zyklustag, 70 Std. nach Explantation.

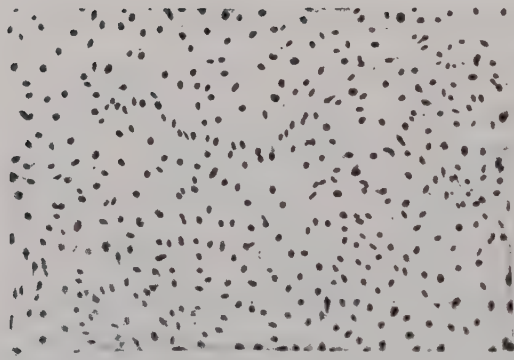


Abb. 33

Endometrium, 29. Zyklustag, 92 Std. nach Explantation.

Abb. 34

Endometrium, 29. Zyklustag, 98 Std. nach Explantation.

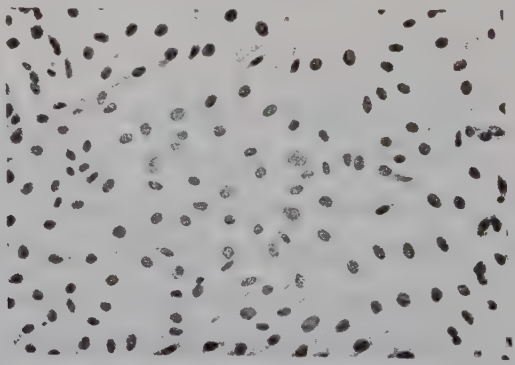
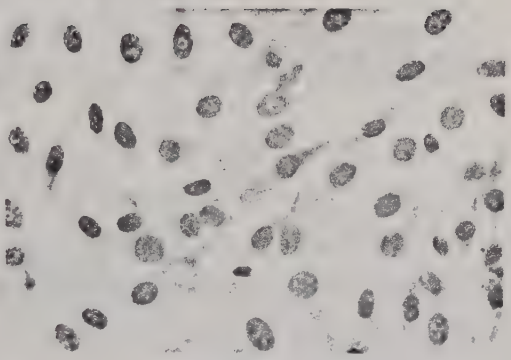


Abb. 35

Endometrium, 29. Zyklustag, 92 Std. nach Explantation. (Vergrösserung)



Für die Funktion der explantierten Zellen aus der Sekretionsphase spricht der Nachweis von ausgeprägtem Glycogenvorkommen mit einem Höhepunkt um den 20. Zyklustag. Häufig sind die Zellen völlig von PAS-positiven Substanzen ausgefüllt. Das Glycogen liegt um den Zellkern verteilt oder befindet sich subnuclear.

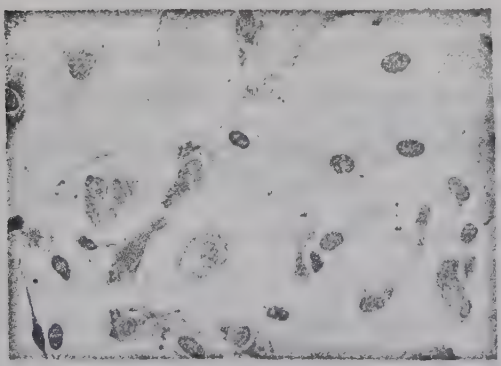
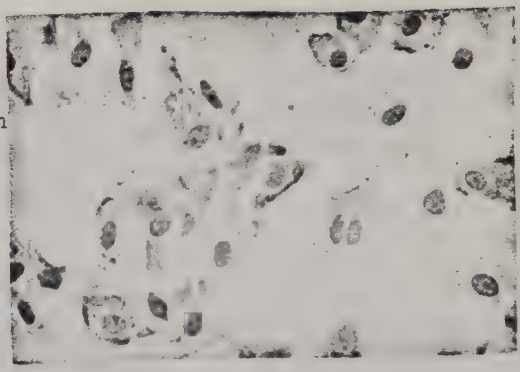


Abb. 36

Endometrium, 20. Zyklustag. Glycogendarstellungen.

Abb. 37
Endometrium
22. Zyklustag.
Glycogendarstellungen



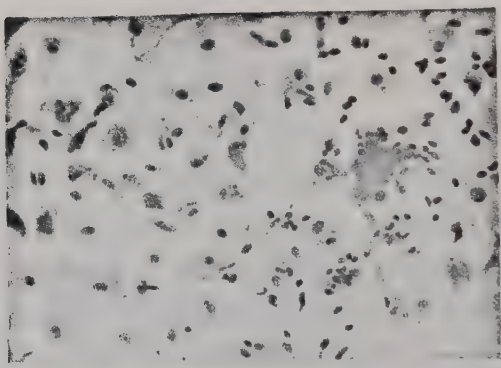


Abb. 38
Endometrium,
20. Zyklustag
Glycogendarstellungen

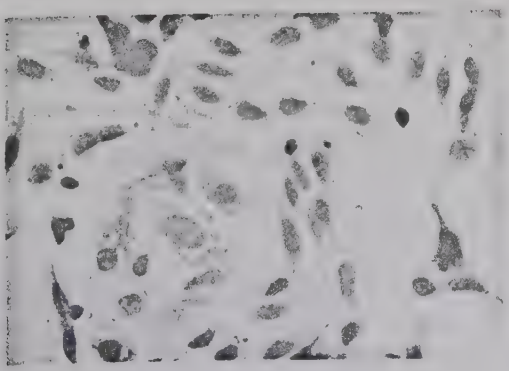
In der prämenstruellen Phase nimmt der Glycogengehalt der Zellen wieder ab. Bei ausgebildetem Zellrasen, wie er in Abbildung 34 und 35 veranschaulicht wird, findet sich im Zytoplasma der Epithelzellen nur noch wenig Glycogen. Dieser Befund entspricht etwa den Ergebnissen, die uns aus den histo-chemischen Untersuchungen der Gebärmutterschleimhaut bekannt sind.
K. FUHRMANN (30), ARRONET, LATOUR, PAYNE, HAGERMANN und A. VILLEC (7) berichten über das Glycogenvorkommen im Endometrium während des Zyklusverlaufes.

Sie erkannten, daß der höchste Gehalt an Glycogen biochemisch zwischen dem 14. und 21. Zyklustag festzustellen ist, mit dem Gipfel etwa um den 17. Zyklustag.

Wir fanden bei der Durchsicht unserer Kulturen, daß die Epithelzellen, die zweifellos den Drüsenzellen des Muttergewebes entstammten, ihren Höhepunkt an Glycogengehalt etwas später, etwa am 20. Zyklustag, erreichen. Über das spätere Auftreten des Glycogens haben wir keine weiteren Untersuchungen angestellt. Zum Vergleich mit dem Glycogenvorkommen in den Epithelnestern des 11. Zyklustages sei die Abbildung 39 herangezogen. Hier liegt das Glycogen, das wir mit Hilfe des Diastasetestes identifizieren konnten, diffus und spärlich im Zelleib der Epithelzellen. Die das Epithelnest umgebenden Spindelzellen sind frei von Glycogeneinschlüssen.

Abb. 39

Endometrium, 11. Zyklustag. PAS-positive Substanzen im Epithelnest.



Zusammenfassung

Zur Beurteilung standen morphologische Kriterien des menschlichen Endometriums nach Explantation in vitro, die einen Rückschluß auf die Zyklusphase des entnommenen Gewebes zulassen. Einhundert Endometriumskulturen waren Gegenstand der Untersuchungen.
Von diesen 100 Kulturen konnten 77 Explantate beurteilt werden. Die vergleichenden morphologischen und zytochemischen Untersuchungen fanden an fixierten und gefärbten Präparaten statt.

Folgende Ergebnisse der morphologischen Studie wurden ermittelt:

1. In der frühen Follikelphase, 4.-8.Tag der Regel, wachsen die Zellen in Spindelzellen aus. Sie liegen zunächst vereinzelt, sind aber bald fischzugartig geordnet. Zwischen den Spindelzellanordnungen erscheinen 3 Tage später Epithelzellnester, deren Zellen keine PAS-positiven Substanzen und kein Glycogen enthalten.

2. Die Zellkultur der mittleren Follikelphase, 7.-10.Tag der Regel, zeichnet sich durch eine vermehrte Anzahl der Epithelnester aus. Das fischzugartige Auswachsen

der Spindelzellen bleibt unverändert. In den epithelialen Zellen sind weder PAS-positive Substanzen noch Glycogenpartikel vorhanden.

3. In der späten Follikelphase, 11.-14. Tag der Regel, erscheinen in den Kulturen netzartige Strukturen, die von spindeligen Zellen gebildet werden. In den Überkreuzungspunkten des Netzwerkes liegen dichtgedrängt Zellansammlungen, die nach vollständiger Ausbildung der Netzstruktur mit dem Auswachsen beginnen. Sie proliferieren flächenhaft und füllen die Maschen des Netzes mit Epithelzellnestern aus. Man gewinnt den Eindruck einer Drüsenstruktur.
Im Zytoplasma der Epithelzellen erscheinen erstmals PAS-positive Substanzen, die als Glycogen identifiziert werden können. Die Glycogenbestandteile liegen als kleine Tröpfchen in der Nähe des Zellkerns.

4. In der frühen Corpusluteum-Phase, 15.-19. Tag der Regel, werden die Netze dünner. Es bestehen zwar noch einzelne Maschen, die aber nur noch eine Netzstruktur andeuten können.

Mit dem fortschreitenden Wachstum in der Kultur verschwindet die Netzstruktur völlig. Es treten wiederum Epithelzellnester auf, die kräftig ausgebildet sind.
Das Zytoplasma der epithelialen Zellen enthält in größeren Mengen PAS-positive Substanzen, die sich bei histochemischen Untersuchungen als Glycogen erweisen.

5. In den Kulturen des 20. Zyklustages sind die Spindelzellen in den Hintergrund getreten. Gleich in den ersten Stunden nach der Explantation beherrschen die Epithelzellen in kleinen Kolonien, die miteinander konfluieren, das Bild.
Der Glycogengehalt der epithelialen Zelle hat seinen Höhepunkt erreicht.
Wenn vorher einzelne Epithelzellen kein Glycogen beinhalten, so sind jetzt alle Epithelzellen mit Glycogen angereichert.

6. Die prämenstruelle Phase, 26.-29. Zyklustag, ist dadurch gekennzeichnet, daß die gesamte Kulturfläche schon nach einigen Stunden von einem Epithelzellrasen überzogen ist.

Die Spindelzellen, die in der späten Sekretionsphase noch nach 120 Stunden vorhanden sind, sind völlig verdrängt. Bei dieser Phase, unmittelbar vor der Menstruation, ist nur noch wenig Glycogen in den zum Zellrasen ausgewachsenen epithelialen Zellen nachweisbar.

Für die Funktion der explantierten Zellen aus der Sekretionsphase spricht der histochemische Nachweis von Glycogen. Für diesen Nachweis eignet sich die CARNOY-Fixierung in Kombination mit der PAS-Färbung. Die PAS-positiven Substanzen können mit Hilfe des Diastasetestes als Glycogen identifiziert werden.
Diese zytochemische Untersuchung der ausgepflanzten Zellen erlaubt somit eine weitere Klassifizierung und Zuordnung des entnommenen Gewebes zum Stadium des Zyklus.

Die oben angeführten Ergebnisse ließen sich an verschiedenen Kulturen reproduzieren. Die isolierten Stroma- und Epithelzellelemente wuchsen immer wieder zu charakteristischen Bildern aus, die eine morphologische Klassifizierung und einen Rückschluß auf den Zyklusabschnitt des entnommenen Gewebes zulassen.

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse dokumentieren, daß sich durchaus mit der Zellkulturmethode nach DULBECCO-VOGT morphologische und zytochemische Kriterien nachweisen lassen, die eine Zuordnung der Kulturen zu der Zyklusphase des entnommenen Gewebes erlauben. Ähnliche Untersuchungen, die von PAPANICOLAOU, MADDI und anderen Autoren im Plasma-CLOT-Verfahren durchgeführt wurden, waren nicht so aufschlußreich.

PAPANICOLAOU differenzierte zwar Zellen stromatogener Herkunft von epithelialen Zellen. Eine Aussage über das Wachstumsverhalten der einmal proliferierten Zellen in bezug auf die Zyklusphase konnte weder von ihm noch von anderen Autoren, die Endometrien in Organkulturen züchteten, getroffen werden.
Lediglich über das Glycogenvorkommen in Endometriumsexplantaten aus der Sekretionsphase liegen Ergebnisse vor, die den von uns gemachten Beobachtungen entsprechen (TROWELL (28), HUHGES (9)).

In den Organkulturen tritt das Glycogen in den Drüsenzellen des Gewebeverbandes auf, wobei gleichzeitig die Drüse selbst ihre Form verändert.

In der Monolayer-Kultur behält die isolierte epitheliale Zelle ihre ursprüngliche physiologische Potenz bei und lagert in ihrem Zytoplasma, obwohl sie aus dem Drüsenverband ausgelöst ist, Glycogen ein.

Wenn also gewisse physiologische Potenzen der ausgepflanzten Zelle in den Monolayer-Kulturen erhalten bleiben, so dürften bei Fermentuntersuchungen an den Zellen in vitro weitere Klassifizierungsmerkmale zu erwarten sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben es, daß jedes explantierte gesunde Endometrium dem Stadium des Zyklus zugeordnet werden kann.

Es wird nun einerseits vielleicht möglich sein, durch Hormonzugaben zum Kulturmedium ein Endometrium aus der Proliferationsphase in die Sekretionsphase zu führen. Andererseits sind Vergleiche zu hormonal gestörten Endometrien in vitro gegeben.

Wenn der Nachweis der hormonalen Beeinflussung der explantierten Zellen in vitro gelingt, so könnte vielleicht auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit erkranktes Endometrium durch Hormonzusätze in ein phasengerechtes Bild überführt werden.

Die dazu benötigten Hormonkonzentrationen- und Kombinationen wären in vitro austestbar.

Eine weitere Arbeit wird erforderlich sein, um die Korrelation zwischen den experimentellen Ergebnissen zu den klinischen Erfahrungen zu beweisen. Bei der therapeutischen Anwendung der in vitro erfolgreichen Hormonkombination müßte günstigenfalls auch in vivo das erkrankte Endometrium in ein zyklusgerechtes Stadium umzuwandeln sein.
Durch das Anlegen einer Vielzahl von Kulturen wird es möglich sein, verschiedene Hormonkombinationen- und Konzentrationen zu gleicher Zeit auszutesten. Innerhalb von 24 Stunden könnte dann speziell für jedes gestörte Endometrium und damit für jede hormonell erkrankte Frau die zur Heilung spezifische Hormonkombination- und Konzentration festgesetzt werden.

Die eigenen Ergebnisse bei der morphologischen Beurteilung des Endometriums in vitro in den verschiedenen Zyklusphasen dürfen vielleicht als Ausgangspunkt und Fundament für die angedeuteten Möglichkeiten zur klinischen Anwendung dieses Verfahrens angesehen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ARRONET, G.H.
   LATOUR, J.P.A.
   Studies on endometrial glycogen, J. clien. (Endocr. 17, 1957 261)

2. BUTTENBERG, D.
   Gelbkörper-Hormontherapie, med. wiss. Veröffentlichung. Blaschker-Verlag GmbH, Berlin, Seite 17

3. CAFFIER, P.
   Über Endometriumsexplantation. Bisherige Ergebnisse, Wachstumsmechanik und Kritik. Zbl. Gynäk. 52 63-75 (1928)

4. CRON, R.S.
   The viability of the cast of menstrual endometrium. Amer. J. Obsted. Gynec. 13, 645 - 647 (1927)

5. GEY, C.G.
   Zitat nach CAFFIER, s. CRON.

6. DULBECCO, R. u.
   VOGT, M.
   Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. exp. Med. 99 167-182, (1954)

7. HAGERMANN, D. u.
   VILLEC, A.
   Effect of menstrual cycle on the metabolism of human endometrium. Endocrinologie 53 667 (1953)

8. HIRSCH u. JONES, H.O. The behaviour of the epithelium in explants of human endometrium. Amer. J. Obsted.Gynec. 25 37 - 41 (1933)

9. HUHGES, E.C. Organ culture of human endometrium (effect of ovarian steroids) Amer. J. Obsted.Gynec. 105, 707 ff. (1969)

10. HEIM, K. Explantationsversuche mit menschlichen Geweben und Geschwülsten. Arch. Gynäk. 132 14 (1922)

11. HEIM, K. Zur Frage der Endometriumskultur. Zbl. Gynäk. 52, 939 ff. (1928)

12. KÄLLEN, B., KULLANDER The fibrinolytic activity of human endometrium in tissue culture. Acta Obsted. Gynec. Scand. 401 ff. (1961)

13. KOHORN, E.L. et al. R. TCHAO Conversion of proliferative endometrium to secretory endometrium by progesterone in organ culture. J. Endocr. 45 401-405 (1969

14. KRAHE, M. Über das Verhalten von benignen und malignen Zellen des weiblichen Genitales in der Gewebekultur (zugleich ein Versuch der Sensibilitätstestung von menschlichem Karzinomgewebe in der Primärkultur gegen Zytostatika). Habilitationsschrift 1963, Universität des Saarlandes.

15. LUGINBUHL, W.H. Elektronen-mikroskopische Untersuchungen der Glyconeogenese. Amer. J. Obsted.Gynec. 102, 192 ff (1968)

16. MARKUSE, P.M. Short-term tissue cultures of human endometrium. Obsted.Gynec. 6. 349 ff (1955)

17. MORGAN, J.F. Development of sythetic media. In: Methods of Tissue Culture, R.C. Parker, Verlag P.B. Hoeber, Inc., New York, 115 ff (1960)

18. MAYER, A. Über die Bedeutung der künstlichen Gewebezüchtung für die klinische Forschung. Münch.Med. Wschr. 72 2201-2202 (1926)

19. PAYNE, H.W. u. J.P. LATOUR
Quantitative estimation of endometrial glycogen. J. clin. Endocr. 15 1106 ff (1955)

20. RANDALL, J.H. STUERMER, V.M. STEIN R.J.
Cytodynamic properties of human endometrium. 1. Cultivation in fluid media, effects of oxygen tension, hydrogen ion concentration an temperature. Amer. J. Obsted.Gynec. 60 722 ff (1950)

21. PAPANICOLAOU, G.
N.: Atlas of exfoliative cytology. 1954 und Suppl. 1956

22. PAPANICOLAOU, G.
N.: Maddi F.V.: Observation on the behaviour of human endometrial cells in tissue culture. Amer. J. Obsted.Gynec. 76 601 ff (1958)

23. RAUEN, H.N.
Biochemisches Taschenbuch Springer-Verlag 1960

24. STUERMER, V.M. STEIN, R.J.
Cytodynamic properties of human endometrium. Amer. J. Obsted. Gynec. 60 1332 ff (1950)

25. SCHMIDT-MATTHIESEN, H. Das normale menschliche Endometrium. Georg-Thieme-Verlag (1963) 149 ff.

26. THEMANN, H. SCHÜNKE, W. Die Feinstruktur der Drüsenepithelien des menschlichen Endometriums. Elektronenoptische Morphologie. 111 ff Menschl. Endometrium. Georg-Thieme-Verlag.

27. TRAUT, H. F. Adult human endometrium in tissue culture. Surg. Gynec. Obsted. 47 334 ff. (1928)

28. TROWELL Exper. Cell.Res. 16, 118 (1959)

29. FIGGE, D.C. Growth characteristics of human endometrium in tissue culture. Obsted. and Gynec. 16, 269 ff (1960)

Literatur-Anhang

30. FUHRMANN, K. Stoffwechsel menschl. Endometriums. SCHMIDT-MATTHIESEN 279 (1963)

31. MOORE, J.G. Tissue culture studies of endometrium explantedat varyng stages of the menstrual cycle. Fertil. Vteril 7. 411-421 (1956)

32. DULBECCO, R.
VOGT, M.

Onestep growth curve of encephalomyelitis virus on chicken embryo cells grown in vitro and analysis of virus yields from single cells.
J. exp. Med. 99, 183 ff (1954)

33. MORTON, H.J.
MORGAN, J.F.
PARKER, R.G.

Nutrition of animal cells in tissue cultures on their survial in a synthetic medium.
J. Cell.Comp. Physiol. 38 389 (1951)

Herrn Professor Dr. med. M. Krahe
danke ich für die Überlassung des
Themas sowie den fachlichen Rat,
den er mir bei der Durchführung
der Arbeit gewährte.

L E B E N S L A U F

Am 28. 9. 1939 wurde ich als Sohn des Finanzbeamten Eduard Skripitz und seiner Ehefrau Katharina in Altenkirchen/Ww. geboren.
Vom Herbst 1946 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Altenkirchen, ab Ostern 1951 das Neusprachliche Gymnasium der Stadt Altenkirchen.
Im Februar 1962 bestand ich die Reifeprüfung am Neusprachlichen Gymnasium Wissen/Sieg.

Mein Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1962 an der Rheinischen Friedrich Wilhelm Universität Bonn. Hier legte ich am 29. 4. 1963 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 29. 10. 1964 die Ärztliche Vorprüfung ab.

Zum zweiten klinischen Semester wechselte ich zur Medizinischen Akademie in Düsseldorf und bestand am 26. 1. 1968 das Medizinische Staatsexamen.

Die Approbation als Arzt erhielt ich zum 1. Januar 1970. Nach 2 Jahren Medizinalassistentenzeit im St. Martinus-Krankenhaus Düsseldorf war ich 1 Jahr Vollassistent auf der Chirurgischen Abteilung des gleichen Hauses.

Im Januar 1971 wurde ich als wehrpflichtiger Stabsarzt für ein Jahr zur Bundeswehr eingezogen.